

Le biocontrôle des stress biotiques et abiotiques chez le blé : c'est possible

Comby M¹, Ptas S¹, Profizi C¹, Randoux B², Reignault P², Halama P³, Siah A³, Adam F⁴, Khatiri Z⁵, Hamada W⁵, Barakat I⁶, El
Guilli M⁶, Chtaina N⁷, Jacquard C⁸, Courteaux B⁸, Sanchez L⁸, Ait Barka E⁸, Baillieul F⁸, Clément C^{8*}

¹ Soufflet Biotechnologies - France

² Université du Littoral Côte d'Opale - France

³ Institut Supérieur d'Agriculture de Lille - France

⁴ Acolyance (agricultural cooperative) - France

⁵ Institut Agronomique National de Tunisie - Tunisie

⁶ Institut National de la Recherche Agronomique - Maroc

⁷ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II - Maroc

⁸ Université de Reims Champagne Ardenne - France

* corresponding author : christophe.clement@univ-reims.fr

Le biocontrôle des stress biotiques et abiotiques chez le blé : c'est possible

Les travaux présentés ici démontrent que la stimulation de l'immunité végétale peut permettre d'induire chez le blé un certain niveau de tolérance/résistance vis-à-vis de maladies fongiques mais également face à des stress abiotiques (chaleur, sécheresse). Le déclenchement des mécanismes de défense peut être obtenu soit par l'application d'éliciteurs (molécules d'origine naturelle non toxique pour l'environnement), soit par l'utilisation de micro-organismes bénéfiques. Les deux technologies ont prouvé leur efficacité contre la septoriose et la fusariose des épis en conditions standard. En outre, le biocontrôle, basé ici sur la physiologie de la plante, doit prendre en compte l'environnement physique, notamment les conditions de température et de sécheresse qui affectent la physiologie de la plante et donc sa capacité à mettre en œuvre son immunité. Dans ce contexte, les micro-organismes bénéfiques peuvent également contribuer à maintenir une immunité suffisante pour protéger la plante contre des attaques fongiques. Même si l'ampleur de la protection est variété- et pathogène- dépendante, les résultats obtenus jusqu'à présent sont prometteurs et démontrent que le biocontrôle constitue un enjeu clé pour l'agriculture du 21^{ème} siècle.

Biotic and abiotic stress biocontrol in wheat: it's possible

The work presented here demonstrates that the stimulation of plant immunity may induce in wheat some tolerance/resistance to fungal pathogens but also to abiotic stresses (heat, drought). The triggering of defense mechanisms may be obtained either by the application of elicitors (molecules of natural origin and non toxic for the environment), or through the use of beneficial micro-organisms. Both technologies have been proven to be efficient against *Septoria tritici* and *Fusarium* head blight under standard conditions. Moreover, the use of biocontrol is based on plant physiology and must therefore take into account the physical environment, especially temperature and drought conditions that affect plant physiology and thus its capacity to trigger its immunity. In this context, beneficial micro-organisms may contribute to maintain a sufficient level of immunity to protect the plant against fungal attacks. Although the protection rate depends on wheat varieties and the pathogen, the available results are promising and show that biocontrol represents a key point for the agriculture of the 21st century.

INTRODUCTION

Pour répondre à une demande croissante pour l'alimentation humaine et animale, la productivité agricole devra augmenter de 60% au cours des prochaines décennies. La production céréalière, ressource alimentaire la plus importante au monde, devra s'accroître annuellement de près de 1 milliard de tonnes d'ici 2030 afin de relever ce défi, ce qui représente des enjeux considérables (rapport FAO 2015).

Comme la majorité des plantes cultivées, le blé est sensible à différentes formes de stress, biotiques (maladies) et abiotiques (fluctuations environnementales, température, sécheresse ...), en particulier dans le contexte actuel de changement climatique. Ces stress ont un impact considérable sur le rendement mais aussi sur la qualité de la production.

Face aux maladies fongiques, l'emploi de fongicides d'origine chimique demeure actuellement la stratégie la plus sûre pour obtenir un état sanitaire de la récolte satisfaisant. Néanmoins, dans l'optique d'une réduction de l'usage des pesticides, la recherche de solutions alternatives reposant sur des outils « non chimiques » de protection des cultures devient prépondérante. En effet, la nouvelle législation en matière de pesticides pour la protection des cultures, approuvée en 2009 par le parlement européen (Directive 2009/128/EC et Règlement 1107/2009), soumet les utilisateurs à une importante réduction du type de produits phytosanitaires utilisables et à des restrictions sévères d'usage. En France, le ministère de l'agriculture a lancé en 2008 le plan Ecophyto 2018 qui vise à promouvoir une agriculture plus durable avec comme ambition la réduction de 50% de l'usage des pesticides dans les cultures à l'horizon 2018. Face aux difficultés rencontrées jusqu'à présent pour atteindre un tel objectif, le plan Ecophyto 2, présenté en janvier 2015 par le ministre de l'agriculture, reporte ces objectifs pour 2025.

L'utilisation de pesticides constitue néanmoins à l'heure actuelle une démarche fiable pour assurer des rendements de récoltes élevés face aux maladies fongiques, estimées responsables chaque année de 10 à 16% des pertes de récolte globale. Les niveaux de contrôle atteints avec les fongicides sont bons (Chala *et al.*, 2003 ; Mesterházy *et al.*, 2011) mais leur efficacité diffère selon l'espèce fongique (Mesterházy *et al.*, 2003).

La septoriose et la fusariose des épis sont des maladies particulièrement délétères pour les blés cultivés. Ces deux maladies sont classées dans le top 10 des maladies fongiques. A ce jour, il n'existe pas de variété 100% résistante à la septoriose ou à la fusariose et la lutte repose principalement sur l'utilisation de fongicides chimiques. Ces derniers n'ont parfois qu'un effet limité et présentent des risques en termes de santé humaine et de protection de l'environnement (Aktar *et al.*, 2009).

Pour ce qui concerne les conséquences du changement climatique (stress abiotiques), il n'existe pas de « remèdes » chimiques. La gestion des stress abiotiques se fait par le ciblage de variétés plus ou moins tolérantes/résistantes à ces fluctuations environnementales dans les différents schémas de sélection développés par les semenciers ou par l'introduction de gènes de tolérance dans les pays autorisés à semer des

variétés OGM.

Dans la nature, les plantes répondent aux stress biotiques et abiotiques en déclenchant des réponses immunitaires visant la limitation de la progression du pathogène ou des dégâts causés par les fluctuations abiotiques. Une plante est affectée lorsque le pathogène ou le stress physique se développe plus rapidement que son immunité n'est déclenchée. Il est donc logique d'estimer que si l'immunité de la plante est activée avant que la maladie ou le stress abiotique ne se présente, la plante pourra mieux assurer sa protection. Dans cette optique, la stimulation de l'immunité végétale constitue une alternative pertinente qui s'avère prometteuse dans un certain nombre de cas (Reglinski *et al.*, 1994 ; Sanchez *et al.*, 2012 ; Gruau *et al.*, 2015 ; Comby *et al.*, 2017 ; Theocharis *et al.*, 2012).

La stimulation préventive des réactions de défense est opérée de 2 manières différentes qui s'inscrivent pleinement dans le biocontrôle. La première consiste à sprayer des éliciteurs (molécules naturelles non toxiques pour l'environnement) sur différents organes de la plante. La seconde vise à faire coloniser la plante par des micro-organismes bénéfiques (lutte biologique), en surface ou dans les organes de la plante. Ces deux technologies se traduisent *in fine* par un certain niveau de tolérance/résistance de la plante cible aux stress biotiques et/ou abiotiques.

Dans cet article, nous présentons différents essais démontrant la faisabilité du biocontrôle de stress biotiques et abiotiques chez le blé. Les résultats recensés découlent de 3 projets collaboratifs de recherche. Un certain nombre de données étant sous le sceau de la confidentialité, tous les détails ne seront pas systématiquement présentés.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Elicitation du blé contre la septoriose

1.1.1. Matériel végétal

Trois cultivars de blé tendre ont été utilisés : CV1 (sensible), CV2 (moyennement sensible) et CV3 (résistant). Les expériences ont été menées en conditions contrôlées (armoires de croissance), semi-contrôlées (serres) et de terrain (champs).

1.1.2. Inoculum

Les inoculations ont été effectuées avec une souche française de *Mycosphaerella graminicola* (T01193) choisie après un criblage de 8 souches sur les 3 cultivars.

1.1.3. Eliciteurs ou stimulateurs de défenses (SDP)

Au total, 14 stimulateurs de défenses des plantes (SDP) ont été évalués sur les 3 cultivars de blé, en conditions de laboratoire, pour leur niveau de protection vis-à-vis de la septoriose. Pour des raisons de confidentialité, ils sont codés SDP1 à SDP14 (tableau n°1). Ils ont été appliqués à différentes doses allant de D1 (dose forte) à D4 (dose faible), des doses intermédiaires (D2 et D3) ayant également été appliquées.

Les essais ont été réalisés 3 années successives. La première année, les SDP ont été testés seuls. Les années suivantes, sur la base des résultats des années précédentes, les SDP seuls mais aussi des combinaisons ont été évalués. Les essais ont été réalisés sur plusieurs sites différents de manière à prendre en compte la diversité des conditions de culture au champ

1.1.4. Application des éliciteurs

Au laboratoire, les SDP ont été évalués sur de plants de blé au stade 4^{ème} feuille sortante selon le protocole décrit par Siah *et al.* (2010). Les traitements ont été effectués par pulvérisation manuelle 48 h avant inoculation du champignon. Pour chaque modalité, 3 pots de 12 plantes ont été utilisés.

Tableau 1 – SDP utilisés dans cette étude

Produit	Nom commercial ou principe actif	Dose préconisée
SDP1	Acibenzolar-S-Methyl (Bion)	0.06 kg/ha
SDP2	Nutri-phite Excel	3 L/ha
SDP2bis	LBG01F34/Etonan	2 L/ha
SDP3	SDP de synthèse	1 L/ha
SDP3bis	SDP de synthèse	1 L/ha
SDP4	Iodus 2 Céréales	0.5 L/ha
SDP6	SDP de synthèse	1 L/ha
SDP7	Extrait de <i>Trichoderma harzanium</i>	5 L/ha
SDP8	Extrait de micro-organismes	6.75 L/ha
SDP8bis	Extrait de micro-organismes	3.75 L/ha
SDP9	Chitosan	3 L/ha
SDP10	Acides organiques	15 L/ha
SDP11	Extrait de fenugrec	1.5 kg/ha
SDP12	Polysaccharides issus d'algues vertes	5 L/ha

Au champ, les tests ont été réalisés sur des parcelles de 21 m² (2 m X 10,5 m) organisées en bloc de Fischer ou en Split-plot. L'intensité de la maladie a été estimée sur 60 plantes par modalité toutes les semaines en mesurant le pourcentage de surface foliaire malades sur les feuilles F1 (drapeau), F2 et F3. Le rendement a été mesuré pour chaque modalité.

1.1.5. Analyse des données

L'ensemble des expérimentations réalisées au laboratoire a été répété au moins 2 fois. Les résultats sont exprimés en calculant la moyenne des répétitions. Une modalité témoin non traitée (nTI) est incluse dans les essais.

Les notations phénotypiques au champ ont été synthétisées pour chaque modalité en calculant la moyenne des AUPC (« area under disease progress curve ») pour les feuilles F1, F2 et F3. La comparaison des modalités pour l'ensemble des paramètres a été réalisée avec le test ANOVA de Tukey à P = 0.05 avec le logiciel Xlstat.

1.2. Lutte biologique contre la fusariose des épis

1.2.1. Matériel végétal

Deux cultivars de blé tendre ont été utilisés (Apache et Caphorne) cultivés sur des parcelles expérimentales non traitées. Les plantes ont été prélevées à 4 stades de développement (stades 59, GS 61-69, GS 71-79).

1.2.2. Isolement et caractérisation des agents des endophytes

Des organes floraux ont été prélevés à différents stades du cycle de reproduction de la plante pour isoler des endophytes (champignons filamenteux, levures et bactéries) potentiellement utilisables en lutte biologique.

Les micro-organismes isolés ont été conservés dans le glycérol à -80°C (Comby *et al.*, 2017).

1.2.3. Tests d'antagonisme et de biocontrôle

Les tests d'antagonisme ont été effectués *in vitro* avec la souche Fg 1010 de *Fusarium graminearum* et la souche FC 37 de *F. culmorum* (Comby *et al.*, 2017).

Les souches les plus efficaces ont été sélectionnées pour vérifier leur potentiel directement sur les épis. Pour ce faire, des concentrations ajustées de ces micro-organismes ont été co-cultivées avec des épis détachés avant d'être inoculées par les souches de pathogènes (Comby *et al.*, 2017).

1.3. Biocontrôle et changement climatique

1.3.1. Matériel végétal

La même démarche a été adoptée dans des pays à climat particulièrement chaud et sec (Maroc, Tunisie). Deux variétés de blé dur (Aquilal) et de blé tendre (Karim) adaptées au climat local ont été choisies. Les plantes servant aux essais sont cultivées au champ dans les conditions locales de température et de sécheresse.

1.3.2. Isolement des micro-organismes

Des micro-organismes (bactéries, champignons) ont été isolés et caractérisés à partir d'organes de blé dur, de blé tendre, de vigne et d'oignon cultivés à proximité des parcelles. Les micro-organismes ont été isolés et caractérisés comme précédemment.

1.3.3. Inoculation de pathogènes et de micro-organismes

L'inoculum est constitué de graines d'avoine colonisées avec *Zymoseptoria tritici*. L'inoculum est appliqué sur le sol dans les parcelles d'essai à un taux de 300 g/ m² au stade 4 feuilles.

1.3.4. Tests d'antagonisme et de biocontrôle

Les tests d'antagonisme direct et de protection ont été effectués comme précédemment.

2. RESULTATS

2.1. Elicitation du blé contre la septoriose

2.1.1. Essais au laboratoire

Le comportement des 3 cultivars vis-à-vis de la souche T01193 en conditions non traitées a été conforme à leurs niveaux de résistance rapportés précédemment (Fig. 1).

% surface foliaire avec symptômes

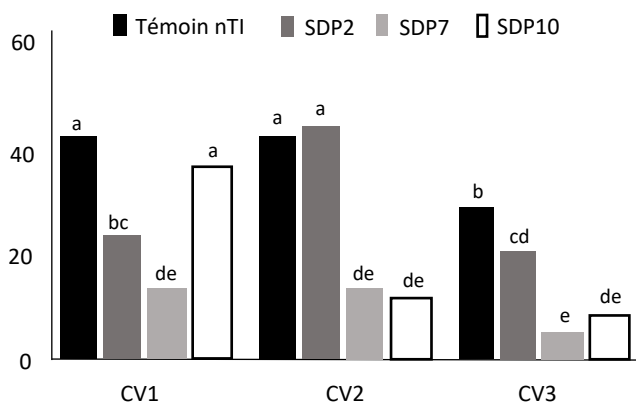


Figure 1 – Efficacité de protection en serre de SDP2, SDP7 et SDP10 sur les symptômes à 21 jpi sur les 3 cultivars. Les moyennes taguées avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Tukey à $P = 0.05$.

Avec la dose D1, 6 SDP ont montré des efficacités de protection significatives sur la septoriose (SDP2, SDP7, SDP8, SDP8bis, SDP9 et SDP10).

Cette efficacité a été observée sur les symptômes (Fig. 1) et sur la sporulation (résultats non montrés). SDP2, SDP7, SDP8, SDP8bis, SDP9 et SDP10 ont réduit les symptômes respectivement de 58, 96, 50, 39, 100 et 70% sur le CV1, de 78, 96, 78, 13, 100 et 88% sur le CV2 et de 69, 97, 80, 71, 100 et 44% sur le CV3. Bien qu'il ait été le plus efficace, SDP9 a également présenté une forte phyto-toxicité se traduisant par une taille plus courte des plantes traitées. Un test supplémentaire avec une demi-dose de D1 a permis de supprimer la phytotoxicité tout en conservant une bonne efficacité sur la maladie (72% sur le CV1, 81% sur le CV2 et 82% sur le CV3).

2.1.2. Essais au champ

La première année, la pression septoriose a été faible à l'échelle nationale, due à une très faible pluviométrie. Peu de différences ont pu être mises en évidence entre les modalités.

L'année suivante, la pression de la septoriose a été significative sur les 3 cultivars. En considérant l'ensemble des cultivars, en particulier l'AUDPC sur l'étage foliaire 2 mais également le rendement, seule la combinaison SDP2+SDP4 appliquée en association avec les fongicides s'est régulièrement distinguée de la référence la plus basse (résultats non montrés).

SDP2, SDP7, SDP8bis et SDP10+SDP4, appliqués en association avec des fongicides, ont permis d'obtenir des niveaux de rendement supérieurs à la référence basse chez le CV1.

2.2. Lutte biologique et fusariose des épis

2.2.1. Effets antagonistes *in vitro*

Au global, c'est 758 souches de micro-organismes qui ont été isolées. Parmi elles, 86 ont été sélectionnées pour être testées vis-à-vis de leur pouvoir antifongique. Ces souches se répartissent en 59 bactéries, 21 champignons filamenteux et 6 levures. Toutes les bactéries caractérisées appartiennent au genre *Bacillus*, notamment *B. amyloliquefaciens*. Pour ce qui concerne les champignons, les espèces isolées sont *Chaetomium globosum*, *Phoma glomerata*, *Clonostachys rosea*, *Microdochium bolleyi*, *Aureobasidium proteae* et *Sarocladium kiliense*.

Les taux d'inhibition des souches pathogènes sont variables, s'étalant de 0 à 51% pour la souche Fg1010 et de 0 à 53% pour la souche Fc37. Un groupe de 22 souches se sont révélées particulièrement efficaces.

2.2.2. Protection des épis

L'effet protecteur des souches pré-sélectionnées *in vitro* a été testé sur des épis détachés. Les données obtenues en antibiose directe ont pu être confirmées sur épis. En particulier, les espèces *P. glomerata*, *A. proteae* et *S. kiliense*, non encore connues en tant qu'agent de lutte biologique, ont démontré le potentiel le plus intéressant.

2.3. Biocontrôle et stress abiotiques

2.3.1. Effets antagonistes *in vitro*

Au global, 120 isolats ont été caractérisés et utilisés pour des

tests d'antagonisme (Fig. 2).

Selon les souches, les niveaux d'inhibition peuvent atteindre 65% après 72h et 71% après 96h de co-inoculation dans la boîte de Pétri. Pour certaines souches de *Trichoderma*, le potentiel d'inhibition peut atteindre jusqu'à 92%.

%age d'inhibition de *Z. tritici*

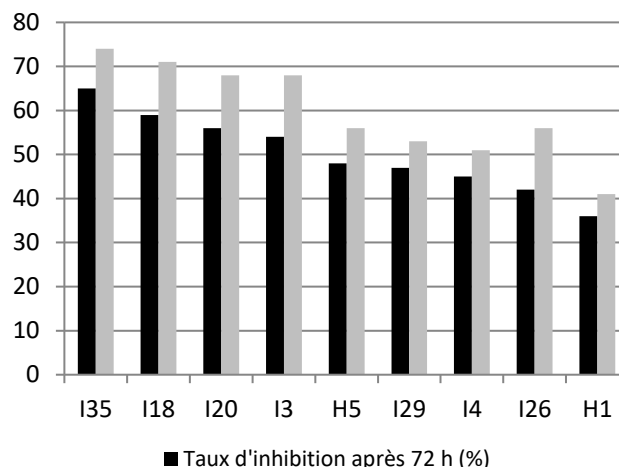


Figure 2 – Pourcentage d'inhibition de *Z. tritici* par des isolats bactériens locaux.

2.3.2. Protection des plantes

Appliquées *in vivo*, les isolats induisent des taux de protection variables selon que le traitement est préventif ou curatif. Pour les meilleurs isolats, la sévérité de la maladie peut se limiter à 0.28 du témoin non traité en utilisation préventive et à 0.56 pour une utilisation curative (Fig. 3) et ce, dans les conditions locales de chaleur et d'hygrométrie.

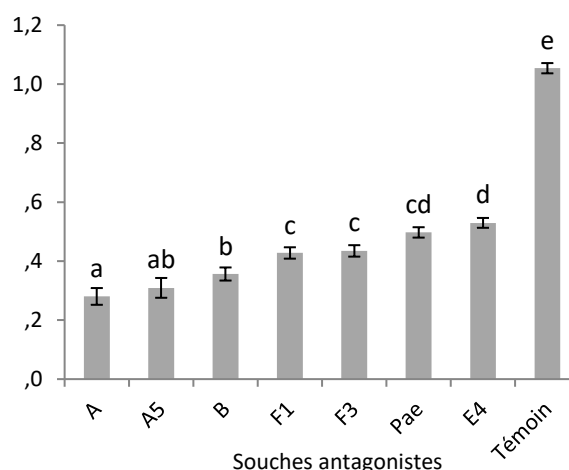


Figure 3 - Comparaison de l'antagonisme *in vivo* des différents isolats de bactéries vis-à-vis de la souche A5-1 de *Z. tritici* sur la variété Karim traitée préventivement. Les barres indiquent les écarts types des moyennes. Les moyennes taguées avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0.05$.

CONCLUSION

Globalement, le biocontrôle des maladies du blé est possible *via* l'utilisation d'éliciteurs ou de micro-organismes appropriés. En particulier, les micro-organismes peuvent en outre contribuer à une adaptation rapide et efficace du blé aux conditions de sécheresse et chaleur intenses.

Pour ce qui concerne l'élicitation, l'étude présentée ici a permis de sélectionner 6 éliciteurs ou SDP sur 14 avec des efficacités significatives vis-à-vis de la maladie. Certains produits ont été écartés compte tenu de leur phytotoxicité ou d'irrégularités d'efficacité (ex : SDP8). Au champ l'efficacité des SDP est effective dès lors qu'ils sont associés à des fongicides traditionnels. L'efficacité, même relative des produits testés ici est liée d'une part à leur capacité à stimuler l'immunité végétale

mais également un certain pouvoir fongicide direct.

L'utilisation de micro-organismes endophytes antagonistes des pathogènes en application locale constitue également une approche prometteuse. Un travail demeure nécessaire pour consolider les connaissances aussi bien des souches d'agents de biocontrôle que des méthodes d'application pour une efficacité optimale. En outre, au plan des méthodes d'actions, ces micro-organismes pourraient être dotés en outre d'une activité de stimulation de l'immunité végétale.

Quelle que soit la stratégie choisie, il ressort de ces travaux que le biocontrôle constitue un réel enjeu pour le développement d'une agriculture durable dans la mesure où il contribue non seulement à limiter l'utilisation de pesticides traditionnels mais aussi à faciliter la culture dans des conditions climatiques difficiles, notamment vis-à-vis de la chaleur et de la sécheresse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aktar W., Sengupta D., Chowdhury A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2, 1–12.
- Chala A., Weinert J., Wolf G., 2003. An integrated approach to the evaluation of the efficacy of fungicides against *Fusarium culmorum*, the cause of head blight of wheat. *J. Phytopathol.* 151, 673–678.
- Comby M., Gacoin M., Robineau M., Rabenoelina F., Ptas S., Dupont J., Profizi C., Baillieul F., 2017. Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different *in vitro* tests. *Microbiol. Res.* 202: 11-20, doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.014.
- Gruau C., Trotel-Aziz P., Villaume S., Rabenoelina F., Clément C., Baillieul F., Aziz A., 2015. *Pseudomonas fluorescens* PTA-CT2 triggers local and systemic immune response against *Botrytis cinerea* in grapevine. *Mol. Plant Micr. Inter.* 28, 1117 – 1128.
- Mesterházy Á., Bartók T., Lamper C., 2003. Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium*, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of *Fusarium* head blight. *Plant Dis.* 87, 1107–1115.
- Mesterházy Á., Tóth B., Varga M., Bartók T., Szabó-Hevér Á., Farády L., Lehoczki Krsjak S., 2011. Role of fungicides, application of nozzle types, and the resistance level of wheat varieties in the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol. *Toxins* 3, 1453–1483.
- Reglinski T., Lyon G.D., Newton A.C., 1994. Assessment of the ability of yeast-derived elicitors to control barley powdery mildew in field. *New Phytol.* 101, 1-10.
- Sanchez L., Courteaux B., Hubert J., Kauffmann S., Renault J.H., Clément C., Baillieul F., Dorey S., 2012. Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiol.* 160, 1630-1641.
- Siah A., Deweer C., Duyme F., Sanssené J., Durand R., Halama P., Reignault P., 2010. Correlation of *in planta* endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathol.* 59, 661-670.
- Theocharis A., Bordiec S., Fernandez O., Paquis S., Dhondt-Cordelier S., Baillieul F., Clément C., Ait Barka E., 2012. *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN primes *Vitis vinifera* L. and confers a better tolerance to low non-freezing temperatures. *Mol. Plant Micr. Inter.* 25, 241-249.